

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication
(à utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 717 498

②1 N° d'enregistrement national : 94 03179

⑤1 Int Cl⁹ : C 12 N 15/12, C 07 H 21/00, C 12 P 21/02, 21/08,
C 12 Q 1/68

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 18.03.94.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 22.09.95 Bulletin 95/38.

⑤8 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE
ATOMIQUE, Etablissement public — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Carosella Edgardo Delfino, Moreau
Philippe, Gluckman Ellane et Kirszenbaum Marek.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Ores.

⑤4 Transcrits du gène de CMH de classe I HLA-G et leurs applications.

⑤7 Transcrits du gène du complexe majeur d'histocompa-
tibilité (CMH) de classe I HLA-G, présents dans les tropho-
blastes fœtaux et/ou dans les lymphocytes circulants de
l'adulte ainsi que leurs applications.

Lesdits transcrits comprennent successivement de 5' en
3' : un fragment codant pour le peptide signal (exon 1), un
fragment codant pour le domaine $\alpha 1$ (exon 2), un fragment
codant pour le domaine $\alpha 2$ (exon 3), un fragment codant
pour le domaine transmembranaire TM (exon 5), un frag-
ment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) et le
fragment 3' non traduit (exon 8), laquelle séquence est dé-
nommée HLA-G 3-5.

FR 2 717 498 - A1



La présente invention est relative à des transcrits du gène du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I HLA-G, présents dans les trophoblastes foetaux et/ou dans les lymphocytes
5 circulants de l'adulte ainsi qu'à leurs applications.

Les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), se divisent en plusieurs classes, les antigènes de classe I (HLA-A, HLA-B et HLA-C) qui présentent 3 domaines globulaires ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$), et dont
10 le domaine $\alpha 3$ est associé à la $\beta 2$ microglobuline, les antigènes de classe II ((HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR) et les antigènes de classe III (complément).

Les antigènes de classe I comprennent, outre les antigènes précités, d'autres antigènes, dits anti-
15 gènes de classe I non classiques, et notamment les antigènes HLA-E, HLA-F et HLA-G ; ce dernier, en particulier, est exprimé par les trophoblastes extravilleux du placenta humain normal.

La séquence du gène HLA-G (gène HLA-6.0) a été
20 décrite par GERAGHTY et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 9145-9149) : il comprend 4396 paires de bases et présente une organisation intron/exon homologue à celle des gènes HLA-A, -B et -C. De manière plus précise, ce gène comprend 8 exons et une extrémité non traduite
25 3'UT, correspondant respectivement : exon 1 : séquence signal, exon 2 : domaine $\alpha 1$, exon 3 : domaine $\alpha 2$, exon 4 : domaine $\alpha 3$, exon 5 : région transmembranaire, exon 6 : domaine cytoplasmique I, exon 7 : domaine cytoplasmique II, exon 8 : domaine cytoplasmique III et région 3'
30 non traduite (GERAGHTY et al., précité, ELLIS et al., J. Immunol., 1990, 144, 731-735). Toutefois le gène HLA-G diffère des autres gènes de classe I, en ce que le codon de terminaison de traduction, en phase, est localisé au niveau du deuxième codon de l'exon 6 ; en conséquence, la
35 région cytoplasmique de la protéine codée par ce gène

HLA-6.0 est considérablement plus courte que celle des régions cytoplasmiques des protéines HLA-A, -B et -C.

Contrairement aux autres antigènes de classe I, cet antigène HLA-G (clones G 6.0 et BeWO.G7) ne serait pas polymorphique et ne serait pas exprimé dans d'autres types cellulaires que les trophoblastes (ELLIS et al., J. Immunol., 1990, précité).

D'autres clones HLA-G ont été isolés (TAMAKI et al., Microbiol. Immunol., 1993, 37, 8, 633-640) ; en particulier, le clone HLA-G, dénommé 7.0E, a été isolé d'un placenta japonais et sa séquence en aminoacide s'est révélée identique à celle des clones précités G6.0 et BeWO.G7. Les Auteurs de cet article montrent, en outre, qu'il peut exister une certaine hétérogénéité dans les gènes HLA-G.

Ces antigènes HLA-G sont essentiellement exprimés par les cellules cytotrophoblastiques du placenta ; toutefois, l'ARNm HLA-G a été retrouvé dans les tissus de l'oeil et dans le foie foetal (ISHITANI et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 3947-3951 ; dont la numérotation correspond à celle de la séquence HLA 6.0 telle que décrite dans SHUKLA et al., Nucleic Acids Research, 1990, 18, 8, 2189).

Les antigènes HLA-G exprimés par les cytotrophoblastes sont considérés comme jouant un rôle dans la protection du placenta (absence de rejet). En outre, dans la mesure où l'antigène HLA-G est monomorphique, il peut également être impliqué dans la croissance ou la fonction des cellules placentaires (KOVATS et al., Science, 1990, 248, 220-223).

D'autres recherches concernant cet antigène non classique de classe I (ISHITANI et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 3947-3951) ont montré que le transcrit primaire du gène HLA-G peut être épissé de plusieurs manières et produit au moins 3 ARNm matures distincts : le transcrit primaire d'HLA-G fournit une

copie complète (G1) de 1 200 bp, un fragment de 900 bp (G2) et un fragment de 600 bp (G3).

Le transcrit G1 ne comprend pas l'exon 7 et correspond à la séquence décrite par ELLIS et al. (précité), c'est-à-dire qu'il code pour une protéine qui comprend une séquence leader, trois domaines externes, une région transmembranaire et une séquence cytoplasmique. L'ARNm G2 ne comprend pas l'exon 3, c'est-à-dire qu'il code pour une protéine dans laquelle les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 3$ sont directement joints ; l'ARNm G3 ne contient ni l'exon 3, ni l'exon 4, c'est-à-dire qu'il code pour une protéine dans laquelle le domaine $\alpha 1$ et la séquence transmembranaire sont directement joints.

L'épissage qui prévaut pour l'obtention de l'antigène HLA-G2 entraîne la jonction d'une adénine (A) (provenant du domaine codant pour $\alpha 1$) avec une séquence AC (issue du domaine codant pour $\alpha 3$), ce qui entraîne la création d'un codon AAC (asparagine) à la place du codon GAC (acide aspartique), rencontré au début de la séquence codant pour le domaine $\alpha 3$ dans HLA-G1.

L'épissage généré pour l'obtention de HLA-G3 n'entraîne pas la formation d'un nouveau codon dans la zone d'épissage.

Les Auteurs de cet article ont également analysés les différentes protéines exprimées : les 3 ARNm sont traduits en protéine dans la lignée cellulaire .221-G.

Les Auteurs de cet article concluent à un rôle fondamental de l'HLA-G dans la protection du placenta vis-à-vis d'une réponse immune maternelle (induction d'une tolérance immune). Toutefois, il est précisé que le rôle de la protéine G3, qui ne contient pas le domaine $\alpha 3$ n'est pas établi.

La complexité du CMH et le rôle de l'antigène HLA-G dans les mécanismes de tolérance ont conduit les

Inventeurs à rechercher un transcrit HLA-G, qui pourrait à la fois :

- aisément être mis en évidence dans le sang périphérique,

5 - serait apte à exprimer, dans des conditions appropriées, une protéine convenable en tant qu'agent de tolérance,

 - permettrait de sélectionner des cellules souches immatures aptes à être utilisées dans des greffes
10 de moelle osseuse,

- et permettrait également de mettre en évidence dans le sang maternel, des cellules foetales dans lesquelles ce gène s'exprime.

En conséquence, la présente invention s'est
15 donné pour but de pourvoir à une séquence issue d'un ARNm du gène HLA-G apte à résoudre l'ensemble des problèmes exposés ci-dessus.

Une telle séquence trouve application notamment :

20 - dans la séparation, dans un échantillon de sang maternel, des cellules foetales,

- dans un procédé d'enrichissement en cellules souches immatures, aptes à être utilisées dans les greffes de la moelle et

25 - dans la séparation spécifique des lymphocytes.

La présente invention a pour objet une séquence d'ADNc issue d'un ARNm du gène HLA-G humain du CMH, caractérisée en ce qu'elle comprend successivement
30 de 5' en 3' :

- un fragment codant pour le peptide signal (exon 1),

- un fragment codant pour le domaine $\alpha 1$ (exon 2),

35 - un fragment codant pour le domaine $\alpha 2$ (exon 3),

- un fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5),
- un fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) et
- 5 - le fragment 3' non traduit (exon 8),
laquelle séquence est dénommée HLA-G 3-5.

Une telle séquence a la particularité de ne pas inclure l'exon 4 et de présenter l'ensemble des propriétés énumérées ci-dessus.

10 Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite séquence comprend successivement de 5' en 3' :

- le fragment codant pour le domaine $\alpha 2$ (exon 3),
- 15 - le fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5),
- le fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) et
- le fragment 3' non traduit (exon 8).

20 Conformément à l'invention, une telle séquence qui code pour une protéine dans laquelle le domaine $\alpha 2$ et la séquence transmembranaire HLA-G sont directement joints, présente la formule I suivante :

CC AAT GTG GCT GAA CAA AGG AGA GCC TAC CTG GAG GGC ACG
 25 TGC GTG GAG TGG CTC CAC AGA TAC CTG GAG AAC GGG AAG GAG
 ATG CTG CAG CGC GCG G₃/⁵AG CAG TCT TCC CTG CCC ACC ATC
 CCC ATC ATG GGT ATC GTT GCT GGC CTG GTT GTC CTT GCA GCT
 GTA GTC ACT GGA GCT GCG GTC GCT GCT GTG CTG TGG AGX₁ AAG
 AAG AGC TCA G₅/⁶AT TGA AAA GGA GGG AGC TAC TCT CAG GCT
 30 GCA A₆/⁸TG TGA₈/ AACAGCTGCCCTGTGTGGGACTGAGTGGCAAGTCCCTTT
 GTGACTTCAAGAACCCTGACTTCTCTTTX₂TGCAGAGACCAGCCCCACCCCTGTGCCC
 ACCATGACCCTCTTX₃CTCATGCTGAACTGCATTCCCTTCCCCAATCACCTTTCCTGT
 TCCAGAAAAGGGGCTGGGATGTCTCCGTCTCTGTCTCA

dans laquelle X₁ représente G ou A,

35 X₂ représente C ou G,

X₃ représente T ou C,

et comprend 0,43 kb.

De manière inattendue, un tel transcrit est détecté aussi bien dans les trophoblastes (premier trimestre de gestation) que dans les lymphocytes circulants chez l'adulte.

La présente invention a également pour objet un produit de transcription du gène HLA-G humain du CMH, caractérisé en ce qu'il inclut, à partir de l'extrémité 5' :

- 10 - un fragment codant pour le peptide signal,
- un fragment codant pour le domaine $\alpha 1$,
- un fragment codant pour le domaine $\alpha 2$,
- un fragment codant pour le domaine transmembranaire TM, et
- 15 - un fragment codant pour le domaine cytoplasmique de HLA-G et en ce qu'il comprend 0,43 kb.

La présente invention a également pour objet des fragments oligonucléotidiques de la séquence conforme à l'invention ; parmi ces fragments, dont la numérotation correspond à celle de la séquence HLA 6.0, telle que décrite dans SHUKLA et al. précité, on peut citer :

- GGA AGA GGA GAC ACCG GAA CA (formule II), dénommé G.257 (+), situé au niveau de l'exon 2 et correspondant au fragment 257-276 de ladite séquence d'ADNc ;
- 25 - CCA ATG TGG CTG AAC AAA GG (formule III), dénommé G.526 (+), situé au niveau de l'exon 3 et correspondant au fragment 526-545 de ladite séquence d'ADNc ;
- CCC CTT TTC TGG AAC AGG AA (formule IV), dénommé G.1200 (-) et correspondant au fragment 1200-1219
- 30 de ladite séquence d'ADNc ;
- TGA GAC AGA GAC GGA GAC AT (formule V), dénommé G.1225 (-) et correspondant au fragment 1225-1244 de ladite séquence d'ADNc ;
- CAG CGC GCG GAG CAG TCT TC (formule VI),
- 35 dénommé G.3.5 (+) et correspondant à la jonction exon 3-exon 5 de ladite séquence d'ADNc.

La présente invention a également pour objet des sondes nucléotidiques, caractérisées en ce qu'elles sont constituées par une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus ou un fragment de celle-ci, marquée à l'aide d'un marqueur tel qu'un isotope radioactif, une enzyme appropriée ou un fluorochrome.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite sonde, elle présente la séquence de formule VI ci-dessus, spécifique du transcrit conforme à l'invention.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite sonde, elle présente la séquence de formule IV ci-dessus ; une telle sonde est apte à détecter tous les produits de transcription du gène HLA-G humain du CMH.

La présente invention a également pour objet des amorces, aptes à être utilisées pour amplifier une séquence nucléotidique conforme à l'invention.

Selon un mode de réalisation avantageux desdites amorces, une paire d'amorces préférée comprend :

- (1) GGA AGA GGA GAC ACCG GAA (formule II)
- (2) TGA GAC AGA GAC GGA GAC AT (formule V).

Selon un autre mode de réalisation avantageux desdites amorces, une autre paire d'amorces préférée comprend :

- (3) CCA ATG TGG CTG AAC AAA GG (formule III)
- (4) TGA GAC AGA GAC GGA GAC AT (formule V).

La présente invention a également pour objet des peptides ou fragments peptidiques, caractérisés en ce qu'ils sont codés par au moins un fragment tel que défini ci-dessus ou une portion de fragment ou une combinaison de plusieurs fragments tels que définis ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit peptide répond à la formule VII ci-après :

Asn-Val-Ala-Glu-Gln-Arg-Arg-Ala-Tyr-Leu-Glu-Gly-Thr-Cys-
Val-Glu-Trp-Leu-His-Arg-Tyr-Leu-Glu-Asn-Gly-Lys-Glu-Met-
Leu-Gln-Arg-Ala-Glu-Gln-Ser-Ser-Leu-Pro-Thr-Ile-Pro-Ile-

Met-Gly-Ile-Val-Ala-Gly-Leu-Val-Val-Leu-Ala-Ala-Val-Val-Thr-Glu-Ala-Ala-Val-Ala-Ala-Val-Leu-Trp-Arg-Lys-Lys-Ser-Ser-Asp.

5 Selon un autre mode de réalisation avantageux des peptides conformes à l'invention, ils peuvent être obtenus par synthèse.

Conformément à l'invention, de tels peptides trouvent application en tant que médicaments, notamment dans des compositions immunotolérantes.

10 La présente invention a également pour objet un procédé de sélection et d'enrichissement en cellules hématopoïétiques indifférenciées (cellules sanguines immatures ou cellules souches), caractérisé en ce qu'il comprend :

15 (a) le prélèvement d'un échantillon sélectionné, selon le cas, parmi le sang périphérique, le sang de cordon ombilical ou la moelle osseuse,

(b) le mise en contact dudit échantillon avec des anticorps anti-CD34, (DYNABEADS ; DYNAL/BIOSYS, 20 Compiègne, France)

(c) la séparation des complexes cellules contenant un antigène CD34-anticorps anti-CD34 formés,

(d) la réalisation d'une RT-PCR *in situ* sur les cellules obtenues à l'étape (c) en présence d'une 25 paire d'amorces marquées à l'aide d'un fluorochrome, conforme à l'invention,

(e) la séparation des cellules fluorescentes, et

(f) la sélection des cellules non fluorescentes immatures pluripotentes. 30

Les cellules obtenues en (f) sont des cellules CD34⁺ HLA-G⁻, qui sont les cellules les plus immatures. Un tel procédé permet avantageusement d'obtenir un grand nombre de cellules souches immatures aptes à être utilisées pour des greffes de cellules souches. 35

Selon un mode de mise oeuvre avantageux dudit procédé, la paire d'amorces est sélectionnée parmi les paires (1)-(2) et (3)-(4) telles que définies ci-dessus.

La présente invention a également pour objet
5 un procédé de détection de cellules exprimant le transcrit conforme à l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend, *in situ*, la mise en oeuvre d'une RT-PCR, par :

(a) mise en contact de cellules sanguines avec une paire d'amorces marquées, conforme à l'invention et

10 (b) séparation des cellules marquées par tout moyen convenable, notamment par cytofluorométrie.

La RT-PCR est notamment décrite dans American J. Pathol., 1993, 143, 6, 1527-1534.

La présente invention a également pour objet
15 des anticorps dirigés contre les protéines HLA-G telles que définies ci-dessus.

De manière préférée, de tels anticorps sont obtenus par immunisation d'un animal approprié, avec des peptides selon l'invention.

20 La présente invention a également pour objet un procédé de séparation de cellules foetales nucléées, à partir d'un échantillon de sang maternel, caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) la mise en contact de l'échantillon de
25 sang maternel avec des anticorps dirigés contre les protéines HLA-G telles que définies ci-dessus, et

(2) la séparation des complexes cellules foetales-anticorps obtenus.

Un tel procédé permet le dépistage prénatal
30 d'anomalies foetales et notamment d'aberrations chromosomiques ou d'aberrations géniques et un dépistage prénatal du sexe, à partir des cellules foetales circulantes ainsi isolées, de manière fiable, de la circulation sanguine

maternelle, dans la mesure où seules ces cellules foetales sont porteuses desdites protéines HLA-G.

La présente invention a également pour objet un procédé de séparation spécifique de lymphocytes circulants, caractérisé en ce qu'il comprend, la mise en oeuvre d'une RT-PCR *in situ*, par :

(a) mise en contact de cellules sanguines avec une paire d'amorces marquées conforme à l'invention et

(b) séparation des cellules marquées (cytofluorométrie...).

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Transcrit du gène HLA-G épissé, sans exon 4.

a) Obtention des cellules adultes et des tissus foetaux :

- Les trophoblastes du premier trimestre de gestation sont obtenus lors d'IVG (6-10 semaines de gestation).

- Les foies foetaux du deuxième trimestre sont obtenus, lors d'interruptions thérapeutiques de grossesse (16 semaines de gestation).

Les tissus sont lavés dans un tampon PBS et les trophoblastes ou le foie sont identifiés au microscope et congelés dans de l'azote liquide.

- Des échantillons de sang périphérique humain sont obtenus chez des volontaires (homme normal).

Les mononucléaires sont séparés des polynucléaires par centrifugation de densité (Ficoll-Hypaque®) et l'ARNm est isolé des deux populations.

On obtient également des mononucléaires enrichis en lymphocytes B par immunoabsorption sur billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-CD19 (Dynabeads-Dynal/Biosys, France) et des mononucléaires enrichis en lymphocytes T, par séparation sur Leuko-Pac® (Fenwal Laboratories, USA).

L'enrichissement est d'environ 90 % pour les cellules B et d'environ 87 % pour les cellules T, après estimation par analyse FACS : évaluation des complexes formés respectivement avec des anticorps anti-CD20 ou des anticorps anti-CD3, marqués au FITC et 1.10^5 cellules de chaque sous-population.

b) Isolement de l'ARN et amplification par RT-PCR :

L'ARNm total est isolé à partir d'1 g de tissu congelé ou de 2.10^7 cellules, en utilisant le réactif RNA-Zol B® (Bioprobe Systems, France), conformément aux recommandations du fabricant ; la qualité du produit obtenu est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant à 1,5 %.

L'ADNc est préparé à partir de 10 µg d'ARN total, en présence d'amorce oligo-dT et de transcriptase réverse M-MLV (Gibco-BRL, Life Technologies), par incubation de 20 µl du mélange à 42°C pendant 1 heure, puis à 95°C pendant 5 minutes.

Les fragments PCR qui peuvent être obtenus selon les amorces utilisées (voir Tableau I ci-après), sont représentés à la figure 1.

Pour amplifier le transcrit G.3-5 conforme à l'invention (fragment de 0,43 kb), on utilise de préférence les amorces G.526 et G.1225 (représentées par des flèches horizontales) ; la sonde utilisée pour détecter ce transcrit amplifié est la sonde G.3-5 (représentée par une ligne épaisse).

Les flèches verticales indiquent les sites de restriction spécifiques des exons 3, 4 et 5, utiles pour

l'analyse de restriction des produits de la RT-PCR, clonés dans le vecteur pPCRII (B : BglI ; St : StuI ; Ss : SstI).

TABLEAU I

5

Amorce	Séquence 5'→3'	Localisation ADNc ADN génomique
G.257(+)	GGA AGA GGA GAC ACCG GAA CA	257-276 Ex 2
G.526(+)	CCA ATG TGG CTG AAC AAA GG	526-545 Ex 3
G.1200(-)	CCC CTT TTC TGG AAC AGG AA	1200-1219 3'-UT
G.1225(-)	TGA GAC AGA GAC GGA GAC AT	1225-1244 3'-UT
G.3-5(+)	CAG CGC GCG GAG CAG TCT TC	615-624/ Ex 3/Ex 5 901-910
Classe I (+)	TCC CAC TCC ATG AGG TAT TTC	81-100 Ex 2
Classe I (-)	TCC AGA AGG CAC CAC CAC AG	814-833 Ex 4

Afin de réduire la quantité de produit amplifié non spécifique, l'amplification est réalisée en utilisant une technique dite "hot-start" : dans un tube de réaction, 200 µM de chaque dNTP, 0,1 µg de chaque amorce et une pastille d'AmpliWax® (Cetus-Perkin Elmer, France), dans 50 µl d'un tampon PCR 1X, sont incubés à 75°C pendant 5 min ; dans un second tube, 2 µl de la solution de RT ou 1 µg d'ADN génomique et 3,5 U de Taq polymérase (Cetus-Perkin Elmer) dans 50 µl de tampon PCR 1X sont incubés à 95°C pendant 5 min.

Le contenu des 2 tubes est ensuite mélangé et soumis à 35 cycles de PCR dans les conditions suivantes :
94°C pendant 1 minute,

61°C pendant 1 minute,

72°C pendant 1 minute 30.

La dernière étape d'élongation à 72°C est de 10 min.

5 Les produits PCR sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % et colorés au bromure d'éthidium.

La spécificité des produits obtenus est confirmée par blotting alcalin des fragments (NaOH 0,4 N) sur une membrane de nylon (Hybond N⁺, Amersham, France), puis une hybridation est ensuite réalisée dans un tampon : 5X SSPE, 5X Denhardt, SDS 0,5 %, ADN de sperme de saumon 100 µg/ml, pendant 2 h à 55°C, en présence d'une sonde oligonucléotidique G-1200 marquée au ³²P ([γ-³²P]dATP) et d'un kit de marquage de l'extrémité 5' (Boehringer-Mannheim, France).

Différents contrôles d'amplification sont réalisés : mélange réactionnel RT sans transcriptase reverse M-MLV (RT⁻) et mélange PCR sans matrice d'ADNc (blanc).

20 Par ailleurs, des contrôles positifs sont réalisés avec des amorces ubiquitaires de la classe I des HLA (voir Tableau I).

c) Résultats :

1. Avec les amorces G.526 et G.1225, deux fragments (0,71 kb et 0,43 kb) sont observés après électrophorèse sur gel et coloration au bromure d'éthidium qui s'hybride avec la sonde G1200 (voir figure 1 et figures 2A et B).

2. La RT-PCR de l'ARNm du foie fœtal du 2ème trimestre ne montre aucune bande sur le gel, ni aucun signal d'hybridation, alors que l'amplification avec des amorces des HLA de classe I entraîne un signal positif (figure 2C).

35 L'amplification de l'ADN génomique présente une bande à environ 2,2 kb conformément à la séquence génomique d'HLA-G.

3. Le fragment de 0,71 kb correspond au transcrit HLA-G complet tandis que

4. le fragment de 0,43 kb correspond à un transcrit ne contenant pas l'exon 4 (→276 bp) (HLA-G.3-5 5).

Pour confirmer l'absence de l'exon 4, la bande de 0,43 kb est découpée et séquencée selon la méthode suivante :

Pour générer des matrices de séquençage, les fragments PCR sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 4 %, coupés et élués avec un tampon acétate d'ammonium 0,5 M et EDTA 5 mM et réamplifiés par PCR asymétrique, de manière à générer des produits simple-brin.

Le produit réamplifié est purifié par extraction au phénol-chloroforme, précipité 2 fois avec de l'éthanol, puis séquencé en utilisant le kit de séquençage T7 Sequenase 2.0 (USB/Touzard-Matignon, France).

De plus, les produits de la PCR sont clonés dans le vecteur pPCRII, en utilisant le kit TA Cloning System (Invitrogen, USA), puis séquencés.

Comme le montre la figure 3, le fragment de 0,43 kb présente clairement une jonction entre l'exon 3 et l'exon 5, qui résulte de la perte de l'exon 4.

De plus, le séquençage montre que le transcrit conforme à l'invention ne comprend pas l'exon 7 ; la présence d'un codon stop dans l'exon 6 est en outre observée.

5. Evaluation de la fréquence du transcrit HLA-G.3-5 :

comme suggéré par la figure 2, l'intensité d'hybridation de la bande de 0,43 kb, correspondant au transcrit épissé, est plus faible que celle correspondant à la copie complète ; ceci suggère que ce transcrit est moins abondant dans la population ARNm d'HLA-G.

De manière à évaluer les quantités relatives de ces 2 transcrits, les produits de l'amplification PCR de l'ARNm des trophoblastes du 1er trimestre avec les amorces G.526-G.1225 sont clonés dans le vecteur pPCRII, 5 comme précisé ci-dessus.

Sur 260 clones analysés par hybridation des répliquas, soit avec la sonde G1200, soit avec la sonde G.3-5, environ 210 clones présentent une hybridation positive avec la sonde G.1200 et seulement un clone est 10 positif avec la sonde G.3-5.

Ce clone unique a été séquencé, tandis que 5 clones positifs avec la sonde G.1200, choisis au hasard, sont analysés par leur carte de restriction vis-à-vis d'enzymes spécifiques des exons 3 et 4 (voir figure 1).

15 Une comparaison des séquences montre que le clone positif avec la sonde G.3-5 ne comprend pas l'exon 4, tandis que les 5 autres clones correspondent au transcrit complet.

Ainsi, la fréquence du transcrit conforme à 20 l'invention par rapport au transcrit comprenant la séquence complète peut être estimée à environ 1/200.

La sélection de l'amorce G.526 (spécifique de l'exon 3) a permis d'obtenir, lors de l'amplification PCR, la sélection d'un transcrit dépourvu d'exon 4.

25 L'absence d'exon 4 crée, à la jonction d'épissage un codon GAG (Glu) à la place du codon GAC (Asp) que l'on retrouve dans le transcrit complet.

L'absence d'exon 4 exclut le domaine $\alpha 3$ de la protéine déduite correspondante et confère une nouvelle 30 structure à l'antigène HLA-G, qui peut être exprimé à la surface des cellules trophoblastiques.

Dans cette structure, le domaine $\alpha 2$ et la région transmembranaire sont reliés et peuvent induire 35 des modifications conformationnelles de la protéine de surface.

En particulier, ladite protéine peut présenter une capacité différente de se lier aux peptides.

EXEMPLE 2 : Expression du transcrit HLA-G complet ou du transcrit sans exon 4 dans les lymphocytes périphériques de l'adulte.

La figure 4 montre les résultats de l'amplification PCR obtenue avec les amorces G.257-G.1225, à partir de matrices d'ADNc de cellules mononucléaires périphériques obtenues chez l'homme (sujets mâles).

Une bande de 1 kb est observée en gel d'agarose (Figure 4A) ; une hybridation avec la sonde G.1200 révèle une bande de même dimension (figure 4B).

Conformément à la séquence d'ADNc, cette bande correspond au transcrit HLA-G complet.

Pour confirmer la production de ce transcrit, le produit de la PCR est cloné dans un vecteur pPCRII puis séquencé, selon la méthode exposée ci-dessus.

Le fragment de 1 kb est entièrement homologu avec la séquence HLA-G décrite par SHUKLA et al. (Nucleic Acids Research, 1990, 18, 8, 2189).

L'amplification PCR de l'ADNc à partir d'une population de polynucléaires avec des amorces spécifiques HLA-G génère une bande de faible intensité de même dimension, 0,71 kb, que celle observée avec les mononucléaires (contamination de la fraction polynucléaire par des mononucléaires).

Pour préciser la spécificité cellulaire de l'expression du gène HLA-G chez les lymphocytes circulants de l'adulte, les populations mononucléaires ont été séparées et une PCR a été réalisée avec des amorces spécifiques HLA-G sur l'ADNc obtenu à partir de sous-populations enrichies en cellules T ou en cellules B.

Une bande de 1 kb est observée pour les fractions cellules T aussi bien en gel d'agarose qu'en ana-

lyse par blot après hybridation avec la sonde G.1200 (figures 4A et B) (transcrit complet).

L'utilisation d'une technique PCR *hot-start* a permis de mettre en évidence la présence d'ARNm de HLA-G dans les lymphocytes périphériques de l'adulte, ce transcrit étant présent à la fois dans les cellules B et les cellules T.

Une bande de 0,43 kb pourrait également être observée.

10 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

REVENDEICATIONS

1') Séquence d'ADNc issue d'un ARNm du gène HLA-G humain du CMH, caractérisée en ce qu'elle comprend successivement de 5' en 3' :

- 5 - un fragment codant pour le peptide signal (exon 1),
- un fragment codant pour le domaine $\alpha 1$ (exon 2),
- un fragment codant pour le domaine $\alpha 2$ (exon 10 3),
- un fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5),
- un fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) et
- 15 - le fragment 3' non traduit (exon 8), laquelle séquence est dénommée HLA-G 3-5.

2') Séquence selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend successivement de 5' en 3' :

- 20 - le fragment codant pour le domaine $\alpha 2$ (exon 3),
- le fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5),
- le fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) et
- 25 - le fragment 3' non traduit (exon 8).

3') Séquence selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle code pour une protéine dans laquelle le domaine $\alpha 2$ et la séquence transmembranaire de HLA-G sont directement joints, en ce qu'elle présente la formule I suivante :

30 CC AAT GTG GCT GAA CAA AGG AGA GCC TAC CTG GAG GGC ACG
 TGC GTG GAG TGG CTC CAC AGA TAC CTG GAG AAC GGG AAG GAG
 ATG CTG CAG CGC GCG G₃/⁵AG CAG TCT TCC CTG CCC ACC ATC
 CCC ATC ATG GGT ATC GTT GCT GGC CTG GTT GTC CTT GCA GCT
 35 GTA GTC ACT GGA GCT GCG GTC GCT GCT GTG CTG TGG AGX₁ AAG

AAG AGC TCA G₅/⁶AT TGA AAA GGA GGG AGC TAC TCT CAG GCT
 GCA A₆/⁸TG TGA₈/ AACAGCTGCCCTGTGTGGGACTGAGTGGCAAGTCCCTTT
 GTGACTTCAAGAACCCTGACTTCTCTTTX₂TGCAGAGACCAGCCCACCCCTGTGCCC
 ACCATGACCCTCTTX₃CTCATGCTGAACTGCATTCCTTCCCCAATCACCTTTCCTGT
 5 TCCAGAAAAGGGGCTGGGATGTCTCCGTCTCTGTCTCA

dans laquelle X₁ représente G ou A,

X₂ représente C ou G,

X₃ représente T ou C,

et en ce qu'elle comprend 0,43 kb.

- 10 4') Produit de transcription du gène HLA-G humain du CMH, caractérisé en ce qu'il inclut, à partir de l'extrémité 5' :

- un fragment codant pour le peptide signal,

- un fragment codant pour le domaine α1,

- 15 - un fragment codant pour le domaine α2,

- un fragment codant pour le domaine transmem-

branaire TM, et

- un fragment codant pour le domaine cytoplas-

mique de HLA-G et en ce qu'il comprend 0,43 kb.

- 20 5') Oligonucléotide, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la séquence de formule II suivante : GGA AGA GGA GAC ACCG GAA CA, dénommée G.257 (+).

- 25 6') Oligonucléotide, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la séquence de formule III suivante : CCA ATG TGG CTG AAC AAA GG, dénommée G.526 (+).

- 30 7') Oligonucléotide, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la séquence de formule IV suivante : CCC CTT TTC TGG AAC AGG AA, dénommée G.1200 (-).

- 35 8') Oligonucléotide, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de la séquence selon l'une

quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la séquence de formule V suivante : TGA GAC AGA GAC GGA GAC AT, dénommée G.1225 (-).

5 9') Oligonucléotide, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la séquence de formule VI suivante : CAG CGC GCG GAG CAG TCT TC, dénommée G.3.5 (+).

10 10') Sondes nucléotidiques, caractérisées en ce qu'elles sont constituées par une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 ou un fragment de celle-ci, marquée à l'aide d'un marqueur tel qu'un isotope radioactif, une enzyme appropriée ou un fluorochrome.

15 11') Sonde selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle présente la séquence de formule VI selon la revendication 9.

20 12') Sonde selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle présente la séquence de formule IV selon la revendication 7.

25 13') Paires d'amorces pour la synthèse d'une séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées en ce que chaque amorce comprend une séquence ou un fragment de séquence selon l'une quelconque des revendications 5 à 9.

30 14') Paire d'amorces selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle est constituée par un oligonucléotide de formule II selon la revendication 5, apparié à un oligonucléotide de formule V selon la revendication 8.

35 15') Paire d'amorces selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle est constituée par un oligonucléotide de formule III selon la revendication 6, apparié à un oligonucléotide de formule V selon la revendication 8.

16') Peptides ou fragments peptidiques, caractérisés en ce qu'ils sont codés par au moins un fragment selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

17') Peptide selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il répond à la formule VII ci-après :

Asn-Val-Ala-Glu-Gln-Arg-Arg-Ala-Tyr-Leu-Glu-Gly-Thr-Cys-Val-Glu-Trp-Leu-His-Arg-Tyr-Leu-Glu-Asn-Gly-Lys-Glu-Met-Leu-Gln-Arg-Ala-Glu-Gln-Ser-Ser-Leu-Pro-Thr-Ile-Pro-Ile-Met-Gly-Ile-Val-Ala-Gly-Leu-Val-Val-Leu-Ala-Ala-Val-Val-Thr-Glu-Ala-Ala-Val-Ala-Ala-Val-Leu-Trp-Arg-Lys-Lys-Ser-Ser-Asp.

18') Procédé de sélection et d'enrichissement en cellules hématopoïétiques indifférenciées (cellules sanguines immatures ou cellules souches), caractérisé en ce qu'il comprend :

(a) le prélèvement d'un échantillon sélectionné, selon le cas, parmi le sang périphérique, le sang de cordon ombilical ou la moelle osseuse,

(b) la mise en contact dudit échantillon avec des anticorps anti-CD34,

(c) la séparation des complexes cellules contenant un antigène CD34-anticorps anti-CD34 formés,

(d) la réalisation d'une RT-PCR *in situ* sur les cellules obtenues à l'étape (c) en présence d'amorces marquées à l'aide d'un fluorochrome selon l'une quelconque des revendications 13 à 15,

(e) la séparation des cellules fluorescentes, obtenues et

(f) la sélection des cellules non fluorescentes immatures pluripotentes.

19') Procédé de détection de cellules exprimant le transcrit selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend, *in situ*, la mise en oeuvre d'une RT-PCR, par :

(a) mise en contact de cellules sanguines avec une paire d'amorces marquées selon l'une quelconque des revendications 13 à 15 et

(b) séparation des cellules marquées par tout
5 moyen convenable.

20') Anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre les protéines HLA-G selon la revendication 16 ou la revendication 17.

21') Procédé de séparation de cellules foetales nucléées,
10 à partir d'un échantillon de sang maternel, caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) la mise en contact de l'échantillon de sang maternel avec des anticorps dirigés contre les protéines HLA-G selon la revendication 20, et

15 (2) la séparation des complexes cellules foetales-anticorps obtenus.

22') Procédé de séparation spécifique de lymphocytes circulants, caractérisé en ce qu'il comprend, *in situ*, la mise en oeuvre d'une RT-PCR, par :

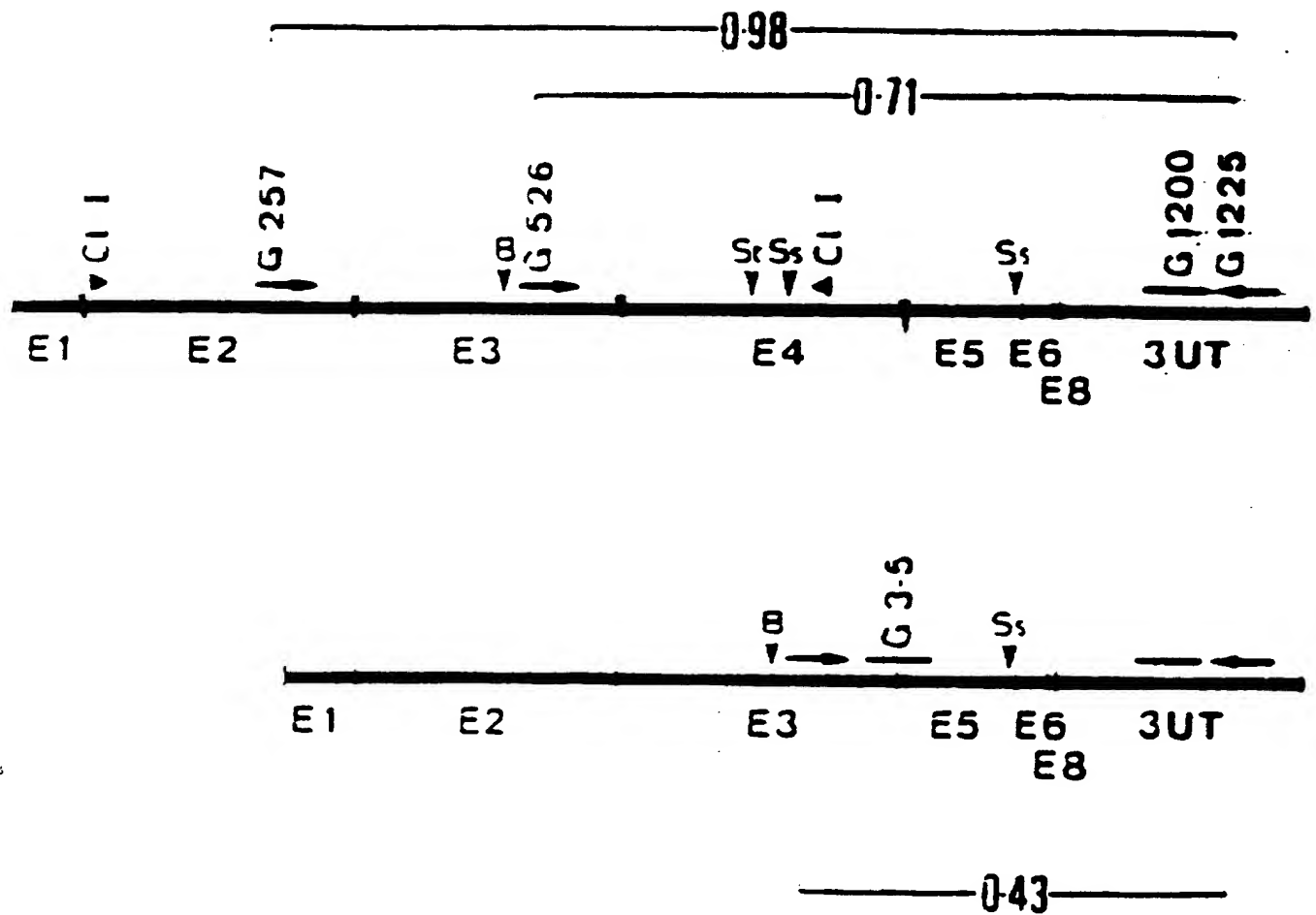
20 (a) mise en contact de cellules sanguines avec une paire d'amorces marquées selon l'une quelconque des revendications 13 à 15 et

(b) séparation convenable des cellules marquées.

25 23') Médicament, caractérisé en ce qu'il comprend un peptide selon la revendication 16 ou la revendication 17

24') Compositions immunotolérantes, caractérisées en ce qu'elles comprennent un peptide selon la revendication 16 ou la revendication 17, associé à un véhicule ou un
30 support convenable du point de vue pharmaceutique.

1/8

FIGURE 1

2/8

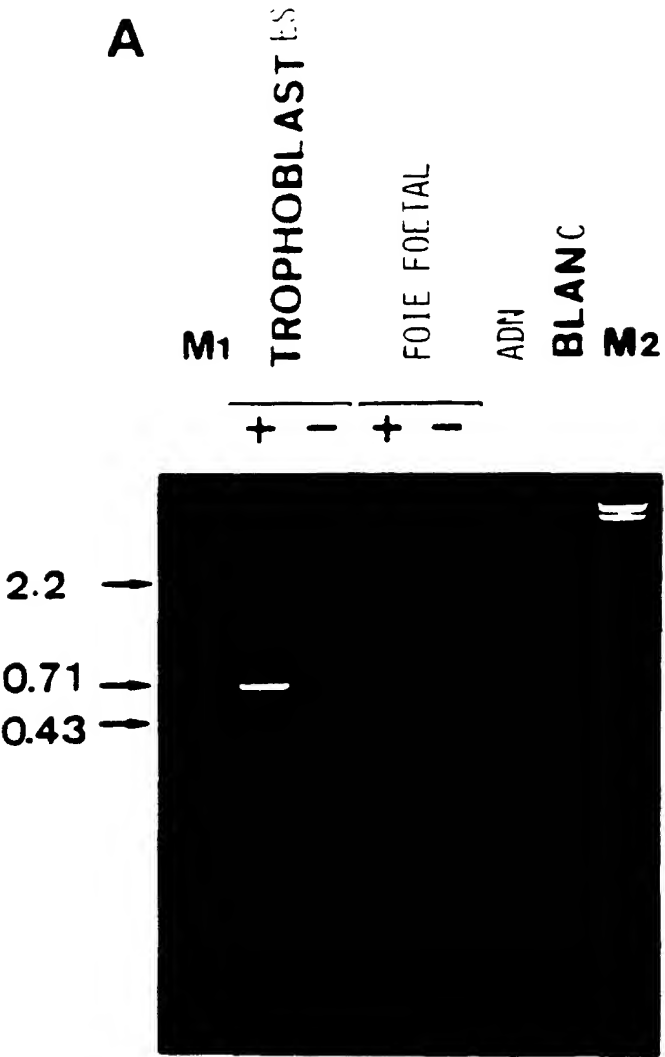


FIGURE 2A

3/8

B

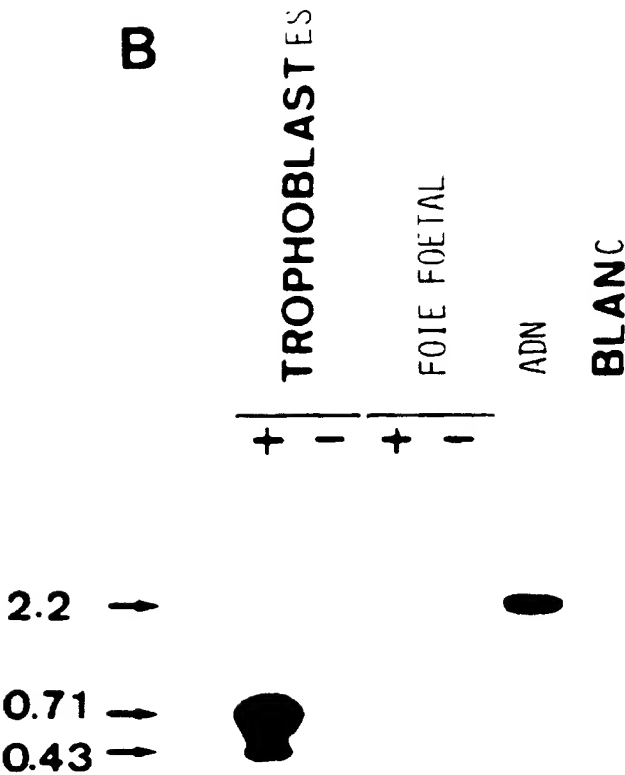
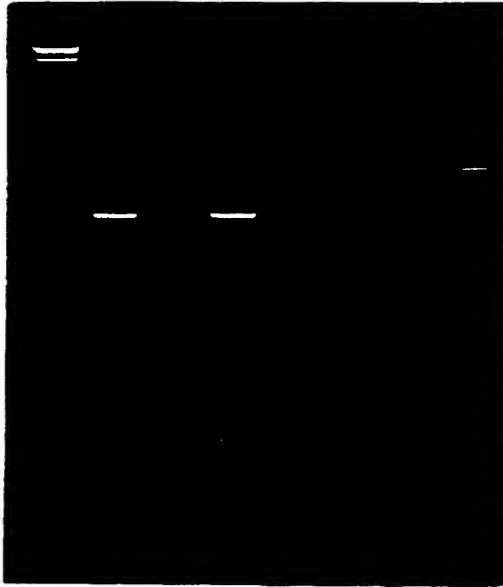


FIGURE 2B

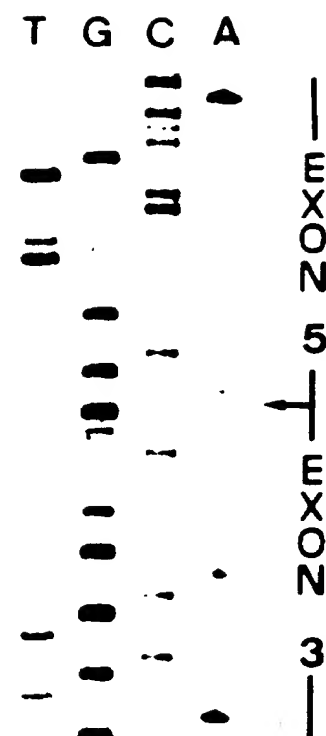
4/8

C

M₂	TROPHOBLASTES		FOIE FOETAL	ADN	BLANC	M₁
		+	-	+	-	

FIGURE 2C

5/8

FIGURE 3A

5/8

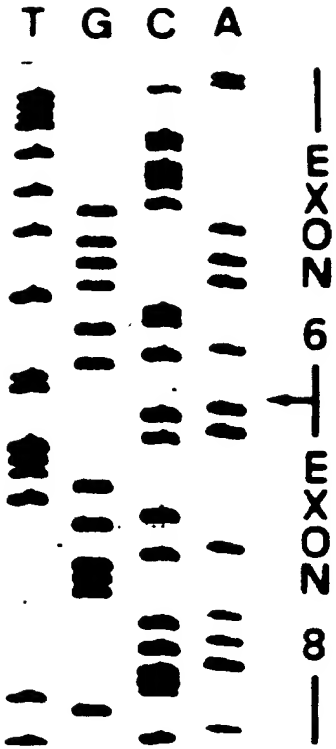
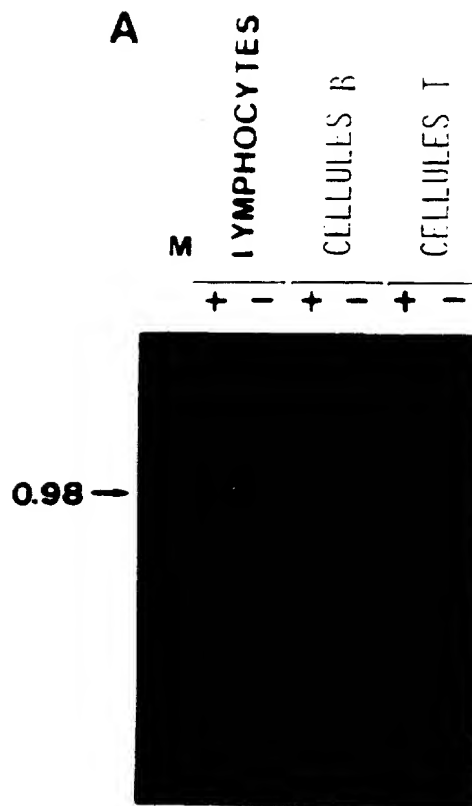


FIGURE 3B

7/8

FIGURE 4A

3/8

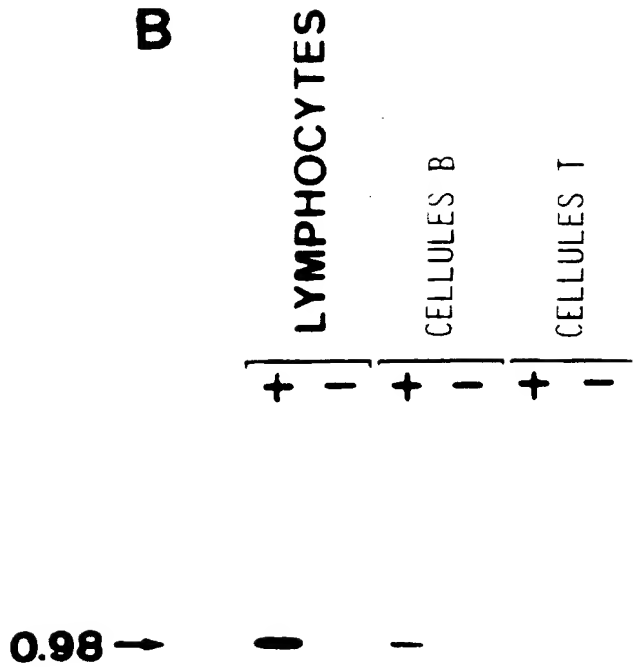


FIGURE 4B

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande principale
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol.18, no.8, 25 Avril 1990, OXFORD, GRANDE BRETAGNE page 2189 H. SHUKLA ET AL. 'The mRNA of a human class I gene HLA G/HLA 6.0 exhibits a restricted pattern of expression.' * le document en entier *	1-15
D,A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol.89, no.9, 1 Mai 1992, WASHINGTON DC, ÉTATS UNIS pages 3947 - 3951 A. ISHITANI ET AL. 'Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens.' * abrégé * * figure 5 *	1-17,20
D,A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol.84, no.24, 15 Décembre 1987, WASHINGTON DC, ÉTATS UNIS pages 9145 - 9149 D. GERAGHTY ET AL. 'A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment.' * abrégé * * figures 1,2 *	1-15
		DOMAINE TECHNIQUE RECHERCHE (S.M.C.S.)
		C12N C12Q C07K G01N A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
30 Novembre 1994		Nooij, F
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul		T : théorie ou principe à la base de l'invention
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
A : pertinent à l'ensemble d'un même une revendication ou arrière-plan technologique général		D : cité dans la demande
: divulgation non-écrite		L : cité pour d'autres raisons
P : document intercalaire		A : membre de la même famille, document correspondant

1

EPO FORM (ISO 651) (P.13)

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, vol.5, no.1, 1993, PHILADELPHIA PA, ÉTATS UNIS pages 3 - 7 D. GERAGHTY 'Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes.' * page 5, colonne de gauche, ligne 6 - ligne 23 *	1-15
A	THE FASEB JOURNAL, vol.7, no.4, 26 Avril 1990, BETHESDA MD, ÉTATS UNIS page A2216 D. GERAGHTY ET AL. 'Production of monoclonal antibodies specific for the new class I antigen HLA-G and their use to examine expression in trophoblast cells.' * résumé 3016 *	20
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.C.S.)
Date d'achèvement de la recherche		Requérant
30 Novembre 1994		No01J, F
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou article-plus technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie en principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>Δ : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 183 (01/93) (FR/CL)

